

サイトカインシグナル伝達分子 STAT3結合タンパク質の機能解析

学位論文内容の要旨

免疫システムの恒常性を維持するためには液性の調節因子であるサイトカインの存在が不可欠であり、そのサイトカインは主に Jak/STAT シグナル伝達系と呼ばれる特異なシグナル系を利用し、機能を発現する。この系を担う Jak チロシンキナーゼと転写因子 STAT (Signal transducer and activator of transcription) は免疫システムの維持、制御に重要な役割を果たす。なかでも B 細胞の抗体産生細胞へ分化に関与する IL-6 等のサイトカインの作用は主にシグナル伝達分子である STAT3 によるものであることが明らかにされている。STAT3 の活性化は細胞の癌化にも非常に重要とされており、実際、ミエローマや種々の癌細胞において恒常的に STAT3 が活性化されていることが報告されている。さらに興味深いことに、人為的に二量体化させた活性型 STAT3 (STAT3-C) によって直接細胞の癌化が誘導されることが明らかになり、STAT3 自身がオンコプロテインとしても注目されている。すなわち、恒常的な STAT3 活性化は直接的あるいは間接的に免疫システムの攪乱を誘導し、自己免疫疾患や細胞の癌化ならびにその増悪に寄与していることから、STAT3 制御機構の解明は自己免疫疾患の治療薬や抗癌剤の開発に繋がることが期待される。この STAT3 の活性化は Jak チロシンキナーゼによる STAT3 チロシンリン酸化に始まり、二量体化、核移行、DNA 結合、脱リン酸化、核外排出等のステップにより制御されている。これらステップにおける破綻が STAT3 の異常な活性化や不活化を誘導する。現在各ステップをターゲットとしたシグナル伝達系に対する創薬が展開されているが、STAT3 制御法の開発を目指して各ステップにおける STAT3 機能解析法を用いて、細胞内 STAT3 結合分子の解析を行った。

そして、分子シャペロン Heat shock protein 90 (Hsp90) による IL-6 シグナル伝達系の制御について明らかにした。Hsp90 阻害剤 Geldanamycin はヒト肝癌細胞株 Hep3B 細胞での、IL-6 刺激による C/EBP δ の発現誘導を顕著に抑制した。また、293T 細胞を用いた一過性のレポータージーンアッセイで、IL-6 刺激で誘導された STAT3 の転写活性化は Geldanamycin の用量依存的に抑制され、この抑制効果は Hsp90 により回復した。293T 細胞での共発現系を用いた実験から、STAT3 と Hsp90 は直接相互作用し、Hsp90 が STAT3 の安定化分子として働くことが示唆された。

また、新たな STAT3 の機能制御に関与する分子の同定を目的として酵

母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行った。STAT3 の linker 部位から C 末端側の領域 STAT3 (494-750) を Bait に用い、STAT3 の新規相互作用分子としてセリンスレオニンキナーゼ、ZIP キナーゼ ZIP キナーゼ (Zipper-interacting protein kinase; ZIPK) を同定した。ヒト胎生腎癌細胞 293 T に STAT3 と STAT3 キナーゼを共発現させ、両分子の動物細胞内での相互作用を確認したところ、この相互作用は STAT3 に特異的なものであり、他の STAT ファミリーとは相互作用しなかった。さらに 293 T 細胞による共沈実験により両蛋白質の相互作用部位を決定した。両蛋白質の欠質変異体を用いた相互作用部位解析の結果、ZIPK のキナーゼドメインを介して STAT3 の DNA 結合ドメインおよび SH2 ドメイン、転写活性化ドメインを含む C 末端側の領域が相互作用することが明らかとなった。続いてこの相互作用の細胞内局在性をヒト子宮頸癌細胞株 Hela 細胞を用いて調べたところ、興味深いことに ZIPK と STAT3 は核内で共局在した。そして、ZIPK の共発現により STAT3 の転写活性に重要な Ser727 のリン酸化は著しく誘導され、レポータージーン の転写活性は増強した。一方、siRNA による内在性 ZIPK のノックダウンにより STAT3 の転写活性は減弱した。さらに、ZIPK のキナーゼ活性は、IL-6 ファミリーサイトカインの刺激により増強した。これらの結果から、ZIPK が核における STAT3 の新たな制御分子であることが示唆された。

この ZIPK の活性化機構を明らかにするため、ZIPK の自己リン酸化部位の同定を試みた。ZIPK およびその欠失変異体のリコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* kinase assay によりその自己リン酸化を解析した。また、ZIPK のキナーゼドメインに対するセリン、スレオニン残基を含む合成ペプチドを作製し、これらを基質として、リコンビナント ZIPK の合成ペプチドに対するリン酸化を解析した。ZIPK 欠失変異体を用いた *in vitro* kinase assay より、その自己リン酸化部位は、キナーゼドメインの C 末端側領域に存在することが示唆された。また、この領域に対応する合成ペプチドに対しても強いリン酸化が認められた。リン酸化されたペプチド内には 1 つのスレオニン (T) と 2 つのセリン (S) 残基が存在しており、それらをアラニン (A) に置換した T265A, S269A, S273A 変異体キナーゼドメインを 293T 細胞に発現させ自己リン酸化を解析したところ、T265A 変異体のみ自己リン酸化が認められなかった。全長 T265A 変異体においても、野生型に比べて著しい自己リン酸化および基質リン酸化能の減弱が観察された。以上から、Thr265 が ZIPK の活性発現に重要な自己リン酸化部位であることが示唆された。さらに、同定したリン酸化部位に対する抗 phospho-ZIPK (Thr265) 抗体を用いて、IL-6 ファミリーサイトカインの刺激によりそのリン酸化が誘導されることも明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 南 雅 文
副 査 助 教 授 上 原 孝

学 位 論 文 題 名

サイトカインシグナル伝達分子 STAT3結合タンパク質の機能解析

平成17年12月12日に当該申請者に対する学位論文の発表，同15日口頭試問を行い，また平成18年2月10日主論文に関する審査員による書面審査を実施した。

発表内容は新たな STAT3 の機能制御に関与する分子の同定であり、その目的として酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、STAT3 の新規相互作用分子としてセリンスレオニンキナーゼ、ZIP キナーゼ (Zipper-interacting protein kinase; ZIPK) を同定した。ヒト胎生腎癌細胞 293 T に STAT3 と STAT3 キナーゼを共発現させ、両分子の動物細胞内での相互作用を確認したところ、この相互作用は STAT3 に特異的なものであり、他の STAT ファミリーとは相互作用しなかった。さらに 293 T 細胞による共沈実験により両蛋白質の相互作用部位を決定した。両蛋白質の欠質変異体を用いた相互作用部位解析の結果、ZIPK のキナーゼドメインを介して STAT3 の DNA 結合ドメインおよび SH2 ドメイン、転写活性化ドメインを含む C 末端側の領域が相互作用することが明らかとなった。続いてこの相互作用の細胞内局在性をヒト子宮頸癌細胞株 Hela 細胞を用いて調べたところ、興味深いことに ZIPK と STAT3 は核内で共局在した。そして、ZIPK の共発現により STAT3 の転写活性に重要な Ser727 のリン酸化は著しく誘導され、レポータージーン の転写活性は増強した。一方、siRNA による内在性 ZIPK のノックダウンにより STAT3 の転写活性は減弱した。また、ZIPK のキナーゼ活性は、IL-6 ファミリーサイトカインの刺激により増強した。これらの結果から、ZIPK が核における STAT3 の新たな制御分子であることを示した。さらにこの ZIPK の活性化機構を明らかにするため、ZIPK の自己リン酸化部位の同定を ZIPK Thr265 が ZIPK の活性発現に重要な自己リン酸化部位であることを示した。さらに、同定したリン酸化部位に対する抗 phospho-ZIPK (Thr265) 抗体を用いて、IL-6 ファミリーサイトカイ

ンの刺激によりそのリン酸化が誘導されることも明らかにした。

論文発表に続いて発表内容を中心として関連ある専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識、またSTAT3インヒビターの有用性や薬剤開発への応用とその根拠など多岐に亘った。これらに対する回答は、適切かつ高度なものであり、博士の学位を与えるに相応しいと判断した。

提出された学位論文の内容はよくまとまっており、その研究成果は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容であると判断した。

以上の結果、本論文審査委員会は、佐藤紀子氏を博士（薬学）の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。